

УДК 577.15 (088.8)

С.С. Декіна¹, І.І. Романовська¹, О.П. Сотнікова²

¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080,
тел. +38(048)766 20 44, e-mail: s.dekina@gmail.com

²ДУ “Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України”, Французький
бульвар, 49/51, Одеса, 65061

ЛІЗОЦИМВМІСНИЙ ПРЕПАРАТ «ШТУЧНА СЛЬОЗА»: ОТРИМАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ

Мета. Розробка і дослідження хімічних і фізичних властивостей лізоцимвмісних очних крапель «штучна сльоза» – перспективного препарату для лікування синдрому «сухого ока». **Методи.** Бактеріологічну активність лізоциму визначали турбідиметрично, використовуючи як субстрат *Micrococcus lysodeikticus* 4698. Вміст протеїну визначали за методом Лоурі-Хартрі, в'язкість на віскозиметрі Оствальда, густину за допомогою ареометра, осмоляльність препарату – осмометром *Tear Lab Osmolarity System*. **Результати.** Запропоновано перспективний для сльозозамінної терапії препарат «штучна сльоза» у формі очних крапель, що містять лізоцим як природний антибактеріальний компонент сльози. Відзначено повне збереження високої бактеріологічної активності включеного ензиму (38200 ± 2000 од/мл). Показано, що розроблені краплі мають близькі зі слізною рідиною значення в'язкості, густини і осмоляльності, що відповідає вимогам, пред'явленим до таких. Встановлено, що лізоцим, стабілізований в препараті декстраном і гідроксипропілметилцелюлозою, після попередньої стерилізуючої фільтрації зберігається в умовах низьких температур (0–4 °C) протягом 12 місяців з 96,4% збереженням вихідної бактеріологічної активності. **Висновки.** В результаті проведених досліджень вперше розроблено препарат «штучної сльози» у вигляді крапель з включенням лізоцимом. Розроблений препарат перспективний для подальших біологічних досліджень.

Ключові слова: лізоцим, штучна сльоза, декстран, гідроксипропілметилцелюлоза, синдром «сухого ока».

Однією з найбільш важливих проблем у сучасній офтальмології є синдром “сухого ока”, що зустрічається у 9–18% населення розвинених країн світу [3]. Це стан, при якому кількості слізної плівки на рогівці недостатньо, щоб зволжити поверхню ока, в результаті чого можуть виникати зміни, що супроводжуються дискомфортом, а у тяжких випадках – втратою зору. Серед причин захворювання називають безконтрольний прийом антидепресантів і антигістамінних препаратів, використання контактних лінз, косметичних засобів недостатньої якості, тривале перебування в приміщеннях з кондиціонерами, робота за комп'ютером та ін. [2, 4, 8]. Одним з основних методів лікування синдрому «сухого ока» є сльозозамінна терапія [4]. На фармацевтичному ринку України представлений

© С.С. Декіна, І.І. Романовська, О.П. Сотнікова, 2015



широкий спектр препаратів – штучних замінників сльози, що відрізняються між собою в'язкістю і хімічним складом, а також випускаються у вигляді очних крапель, гелів або плівок [1, 2]. Однак серед великої кількості застосовуваних препаратів відсутні “штучні сльози”, що містять лізоцим. Лізоцим (КФ 3.2.1.17), також відомий як мурамідаза або N-ацетилмурамоїлгідролаза, є одним з найбільш важливих бактерицидних компонентів слізної рідини. Ензим секретується основними і допоміжними слізними залозами і на його долю припадає від 20 до 30% загального протеїна [7]. Як правило, при захворюваннях очей, а також при синдромі “сухого ока”, рівень лізоциму в слізній рідині знижується.

Метою роботи була розробка і дослідження хімічних і фізичних властивостей лізоцимвмісних очних крапель «штучна сльоза» як перспективного препарату для лікування синдрому «сухого ока».

Матеріали і методи

У роботі використовували гідроксипропілметилцелюлозу (ГПМЦ) («Benecel™», «Ashland Inc.», США), декстран 60 («Biotika Bohemia s.r.o», Чехія), лізоцим з протеїну курячого яйця (40000 од/мг, «Sigma-Aldrich», Канада), клітини *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 («Sigma-Aldrich», США).

Очні лізоцимвмісні краплі готували наступним чином: змішували 0,39% розчин ГПМЦ, 0,1% розчин лізоциму і 0,1% розчину декстрану 60 у співвідношенні 2:1:1, відповідно. Суміш ретельно перемішували при кімнатній температурі. Як розчинник використовували фізіологічний стерильний розчин NaCl. Отримані краплі піддавали стерилізуючій фільтрації із застосуванням фільтрів «Millipore» в стерильні флакони і зберігали при температурі 0–4 °С. Активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом [5]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що за 1 хв знижує оптичну густину суспензії клітин *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 на 0,001. Вміст протеїну контролювали методом Лоурі-Хартрі [6]. Визначення в'язкості проводили на віскозиметрі Оствальда з діаметром капіляра 0,73 мм. Визначення густини розчину лізоциму, стабілізованого розчинами полімерів, проводили за допомогою ареометра. рН – оптимум активності лізоциму у препараті визначали, додаючи до однакових за активністю проб суспензію клітин у буферних розчинах (0,1 моль/дм³, цитратно- фосфатний 3,0–7,0, фосфатний 8,0–9,0). Термооптимум гідролітичної активності лізоциму визначали у діапазоні температур від 20 до 50 °С. Визначення осмоляльності препарату проводили за допомогою осмометра – Tear Lab Osmolarity System. Досліджуваний розчин заливали у чашку Петрі (10 см³), спеціальним щупом приладу забирали аліквоту розчину і розмішували у приладі.

Дані експериментів піддавали статистичній обробці згідно [9]. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень між серіями експериментів при кількості повторень n=3, і відносно вихідної активності вільного лізоциму (40000 од/мг ензиму).



Результати та обговорення

Серед існуючих препаратів “штучної сльози” як полімери найбільш широко використовують декстран і ГПМЦ, структура яких наведено на рис. 1.

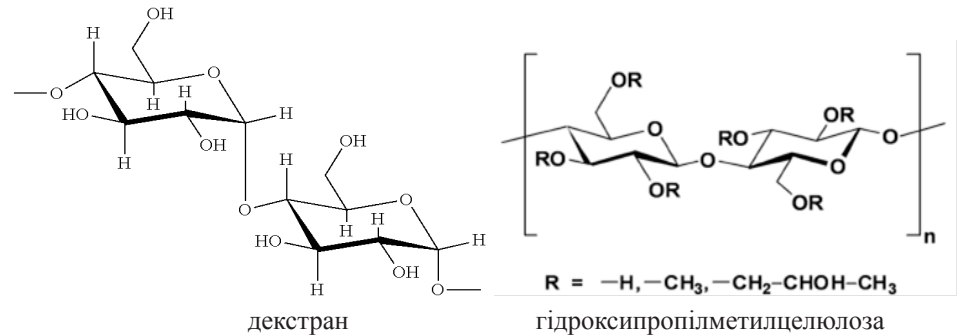


Рис. 1. Структура декстрану і гідроксипропілметилцелюлози

Fig. 1. Structure of dextran and hydroxypropyl methylcellulose

Такі полімерні структури мають велику кількість вільних функціональних груп і можуть утворювати водневі зв'язки з лізоцимом, не порушуючи конформацію ензиму і приводячи до його стабілізації.

Кількість лізоциму для включення в розчини полімерів було вибрано відповідно до його нормального вмісту в сльозі людини ($0,81 \pm 0,31 - 1,68 \pm 0,66$ мг/см³) [7]. Оскільки препарати схожого полімерного складу випускаються і широко використовуються в медицині, основним завданням було дослідити вплив полімерів на біохімічні та фізико-хімічні особливості функціонування лізоциму. Основні характеристики отриманого препарату представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика очних крапель з лізоцимом

Table 1

Characteristics of eye drops with lysozyme

Показник	Результати визначення, $M \pm m$
Гідролітична активність*, од/см ³	38200±2000
Вміст лізоциму, мг/см ³	1,00±0,05
Органолептичні показники	Прозорі, безбарвні, без запаху, липкі
pH-оптимум	7,0–7,4
Термооптимум, °C	40–50
Густина, г/см ³	0,996 ± 0,003
Осмоляльність, мОсм/дм ³	298 ± 2

Примітка. *Достовірність відмінностей між активністю вільного і стабілізованого ферменту $P < 0,05$ при $n=3$



Слід зазначити, що бактеріолітична активність лізоциму при включенні його в розчини полімерів повністю зберігається, що вказує на стабільність ензиму. Отримані результати значень густини розроблених лізоцимвмісних крапель становлять $0,996 \pm 0,003 \text{ г/см}^3$, і близькі до густини слъози людини (1 г/см^3). Осмоляльність препарату становить $298 \pm 2 \text{ мОсм/дм}^3$, дане значення знаходиться також в межах норми слізної рідини ($275\text{--}316 \text{ мОсм/дм}^3$).

При дослідженні в'язкості полімерів відзначено, що в залежності від складу розчину змінюється його кінематична в'язкість (рис. 2).

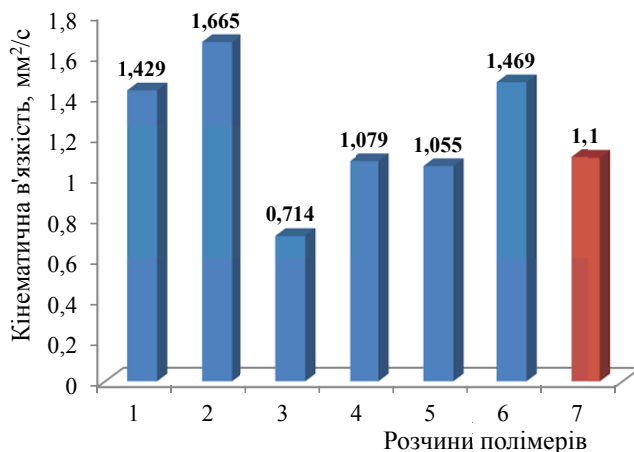


Рис. 2. Кінематична в'язкість розчинів полімерів різного складу:

1 – ГПМЦ (0,39%); 2 – декстран (0,1%); 3 – лізоцим (0,1%); 4 – ГПМЦ + лізоцим; 5 – декстран + лізоцим; 6 – ГПМЦ + декстран; 7 – декстран + ГПМЦ + лізоцим.

Fig. 2. Kinematic viscosity of polymers solutions of different composition:

1 – HPMC (0.39%); 2 – dextran (0.1%); 3 – lysozyme (0.1%); 4 – HPMC + lysozyme; 5 – dextran + lysozyme; 6 – HPMC + dextran; 7 – dextran + HPMC + lysozyme.

Додавання лізоциму у всіх випадках знижує в'язкість полімерів, що може бути обумовлене міжмолекулярними взаємодіями компонентів. Для комплексного препарату кінематична в'язкість становить $1,1 \text{ мм}^2/\text{с}$, що відповідає нормі слізної рідини людини.

Для стерилізації розроблених крапель з лізоцимом використовували метод стерилізуючої фільтрації. Результати досліджень тривалості зберігання препарату свідчать про повну втрату активності водним розчином лізоциму протягом перших тижнів, тоді як стабілізований розчинами полімерів препарат зберігає бактеріолітичну активність протягом 1 року в умовах низьких температур ($0\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$) (табл. 2).

В результаті проведених досліджень розроблено препарат «штучної слъози», що містить лізоцим, з високою бактеріолітичною активністю включеного ензиму ($38200 \pm 2000 \text{ од/см}^3$). Показано, що препарат має близькі до слізної рідини значення в'язкості, густини і осмоляльності, що відповідає вимогам

до таких. Лізоцим, стабілізований розчинами полімерів, після попередньої стерилізуючої фільтрації зберігається в умовах низьких температур (0–4 °С) протягом 12 місяців з 96,4% збереженням бактеріолітичної активності. Розроблений препарат перспективний для подальших біологічних досліджень.

Таблиця 2

Бактеріолітична активність розчинів лізоциму в процесі зберігання

Table 2

Bacteriolytical activity of lysozyme solutions during storage

Час зберігання, міс.	Бактеріолітична активність			
	лізоцим у водному розчині		лізоцим, стабілізований розчином полімерів	
	од/мг (M±m)	%	од/мг (M±m)	%
0,2	40000±2100 *P < 0,05	100	40000±2171 *P < 0,05	100
0,5	13600±884 *P < 0,05, **P < 0,01	34	38200±2130 *P < 0,05, **P > 0,05	100
1	3880±272 *P < 0,05, **P < 0,01	9,7	38200±2084 *P < 0,05, **P > 0,05	100
2	1520±81 *P < 0,05, **P < 0,01	3,8	39200±1370 *P < 0,01, **P > 0,05	98
3	0	0	39120±2190 *P < 0,05, **P > 0,05	97,8
4	0	0	39040±1854 *P < 0,05, **P > 0,05	97,6
5	0	0	38800±2211 *P < 0,05, **P > 0,05	97
6	0	0	38600±1810 *P < 0,01, **P > 0,05	96,5
7	0	0	38720±1664 *P < 0,01, **P > 0,05	96,8
8	0	0	38640±1662 *P < 0,01, **P > 0,05	96,6
9	0	0	38560±2043 *P < 0,05, **P > 0,05	96,4
10	0	0	38600±1845 *P < 0,05, **P > 0,05	96,5
11	0	0	38600±1880 *P < 0,05, **P > 0,05	96,5
12	0	0	38560±1680 *P < 0,01, **P > 0,05	96,4

Примітка. * достовірність між бактеріолітичною активністю лізоциму в водному розчині та лізоциму, стабілізованого розчином полімеру за різних термінів зберігання (n=3). ** достовірність відносно вихідної активності вільного лізоциму (40000 од/мг ензиму).



С.С. Декина¹, И.И. Романовская¹, Е.П. Сотникова²

¹Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, тел.: +38(048)766 20 44, e-mail: s.dekina@gmail.com
²ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»,
Французский бульвар, 49/51, Одесса, 65061

ЛИЗОЦИМСОДЕРЖАЩИЙ ПРЕПАРАТ «ИСКУССТВЕННАЯ СЛЕЗА»: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА

Реферат

Цель. Разработка и исследование химических и физических свойств лизоцим-содержащих глазных капель «искусственная слеза» – перспективного препарата для лечения синдрома «сухого глаза». **Методы.** Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрически, используя в качестве субстрата *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698. Содержание протеина определяли методом Лоури-Хартри, вязкость на вискозиметре Оствальда, плотность с помощью ареометра, осмоляльность препарата – осмометром Tear Lab Osmolarity System. **Результаты.** Предложен перспективный для слезозаменительной терапии препарат «искусственная слеза» в форме глазных капель, содержащих лизоцим – естественный антибактериальный компонент слезы. Отмечено полное сохранение высокой бактериолитической активности включенного энзима (38200 ± 2000 ед/см³). Показано, что разработанные капли имеют близкие со слезной жидкостью значения вязкости, плотности и осмоляльности, что соответствует требованиям, предъявляемым к таковым. Установлено, что лизоцим, стабилизированный декстраном и гидроксипропилметилцеллюлозой, после предварительной стерилизующей фильтрации хранится в условиях низких температур (0–4 °С) в течение 12 месяцев с 96,4% сохранением исходной бактериолитической активности. **Выводы.** В результате проведенных исследований впервые разработан препарат «искусственная слеза» в виде капель с включенным лизоцимом. Разработанный препарат перспективен для дальнейших биологических исследований.

Ключевые слова: лизоцим, искусственная слеза, декстран, гидроксипропилметилцеллюлоза, синдром «сухого глаза».

S.S. Dekina¹, I.I. Romanovska¹, E.P. Sotnikova²

¹A.V. Bogatsky's Physico-chemical institute, NAS of Ukraine,
86, Lustdorf'ska dor., Odesa, Ukraine, 65080, tel.: (048) 765 94 31, e-mail: s.dekina@gmail.com
²SI "The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine",
49/51, Frantsuzskii Boulevard, Odesa, Ukraine, 65061

LYSOZYME-CONTAINING PREPARATION "ARTIFICIAL TEARS": OBTAINING, PROPERTIES

Summary

Aim. The development and study of the chemical and physical properties of eye drops with lysozyme as a perspective drug for the treatment of the syndrome of "dry eye." **Methods.** Activity of egg white lysozyme was determined by bacteriolytic method (with *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 as substrate). Protein content was determined by the Lowry-Hartree method, determination of osmolality of the drug was carried out by osmometer – Tear Lab Osmolarity System. **Results.** A perspective



preparation “artificial tears” for dry eye therapy in form of eye drops with lysozyme was developed. There were noted the complete preservation of bacteriolytic activity of the included enzyme (38200 ± 2000 U/ml). The developed drops have the same values of lacrimal fluid viscosity, density and osmolality. Dextran and hydroxypropylmethyl cellulose stabilized lysozyme in the formulation, with usage of sterilizing filtration stored at low temperatures ($0-4$ °C) for 12 months with 96.4% retention of the original bacteriolytic activity. **Conclusions.** We propose a perspective preparation “artificial tears” for dry eye therapy in form of eye drops with lysozyme as a natural antibacterial component of tears. We have noted the high bacteriolytic activity of the included lysozyme (38200 ± 2000 U/ml). It was shown, that developed drops have the same values of lacrimal fluid viscosity, density and osmolality. It is found that dextran stabilized lysozyme in the formulation and hydroxypropylmethylcellulose, with usage sterilizing filtration stored at low temperatures ($0-4$ °C) for 12 months with 96.4% retention of the original bacteriolytic activity.

Key words: lysozyme, artificial tears, dextran, hydroxypropyl methylcellulose, “dry eye” syndrome.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кольчик О.В., Сорокин П.В. Гидрогели при лечении «синдрома сухого глаза» // Нижегородский медицинский журнал. – 2006. – № 8. – С. 193–196.
2. Полунин Г.С., Куренков В.В., Сафонова Т.Н. и др. Новая клиническая классификация синдрома сухого глаза // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2003. – Т. 3, № 3. – С. 53–56.
3. Придачина Д.В., Жилякова Е.Т., Новикова М.Ю. Современное состояние исследований по офтальмологическим лекарственным формам, направленным на профилактику и лечение синдрома «сухого глаза» // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. – www.science-education.ru/100-4990
4. Bron A.J. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. Part of the series Essentials in Ophthalmology. Dry Eye. – 2015. – P. 1–19.
5. Gorin G., Wang S.F., Papapavlou L. Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells // Anal. Biochem. – 1971. – V. 39, № 1. – P. 113–127.
6. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – V. 48, № 2. – P. 422–427.
7. McDermott A.M. Antimicrobial compounds in tears // Experimental Eye Research. – 2013. – V. 117. – P. 53–61.
8. Stapleton F., Garrett Q., Chan C., Craig J.P. The Epidemiology of Dry Eye Disease // Part of the series Essentials in Ophthalmology. Dry Eye. – 2015. – P. 21–29.
9. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион, 2000, 320 с.

Стаття надійшла до редакції 12.11.2015 р.

